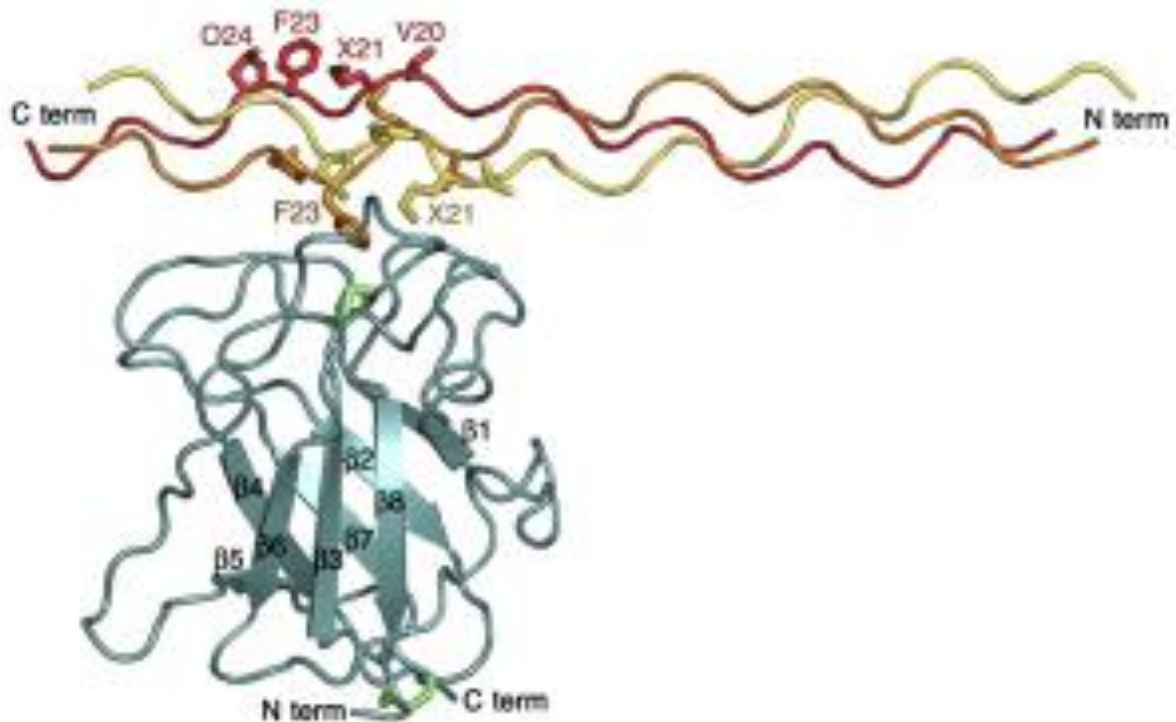


DDR en Fibrose

Wat is de rol van de Discoidine Domein Receptor in het ontstaan van orgaanfibrose?



Auteur: Laurien Talens
Supervisor: Eliane Popa
Afdeling: Pathologie en Medische Biologie, UMCG
Datum: Oktober 2010

Samenvatting

Discoidine domein receptoren (DDR's) zijn receptor tyrosine kinases die aangrijpen op collageen. Er zijn twee typen DDR's. DDR1 komt voornamelijk tot expressie op epitheelcellen in verschillende weefsels en DDR2 wordt voornamelijk tot expressie gebracht op interstitiële cellen in verschillende typen weefsel. DDR's zijn betrokken bij de regulatie van adhesie, proliferatie, migratie en productie en afbraak van de ECM. DDR's spelen een rol in de ontstekingsreactie en orgaan fibrose. In deze literatuurstudie is deze rol onderzocht. Na een beschrijving van de structuur, activatie en signaaltransductie wordt dieper ingegaan op de rol van DDR's in de ontstekingsreactie en orgaan fibrose. De inhibitie van DDR's is mogelijk therapeutisch interessant voor de behandeling van inflammatoire en fibrotische aandoeningen.

Inhoudsopgave

1. Inleiding	p.3
2. Discoidine Domein Receptor	p.4
2.1. Ligand	p.4
2.2. Structuur	p.4
2.3. Activatie en signaaltransductie	p.5
3. De rol van DDR in de ontstekingsreactie	p.5
4. De rol van DDR in orgaan fibrose	p.6
4.1. Nieren	p.8
4.2. Longen	p.10
4.3. Lever	p.11
4.4. Wondheling	p.11
5. Discussie	p.11
Dankwoord	p.13
Literatuurlijst	p.14

Figuur op voorblad: Moleculair model van interactie tussen het Discoidine Domein (blauw) en collageen (geel, oranje, rood, elke kleur representeert een enkele peptideketen) [18]

1. Inleiding

Communicatie tussen cellen en het micromilieu waarin zij zich bevinden is belangrijk voor de regulatie van cellulaire processen. Receptoren op het celoppervlak vertalen signalen uit het extracellulaire milieu in intracellulaire acties. Mogelijke reacties zijn adhesie, proliferatie, differentiatie, migratie en celbehoud [1].

Twee klassen receptoren die betrokken zijn bij cel-matrix interacties zijn de integrines en de receptor tyrosine kinases (RTK) [2]. Integrines grijpen hoofdzakelijk aan op componenten van de extracellulaire matrix (ECM) en spelen een belangrijke rol in de hechting van cellen aan de ECM en in gespecialiseerde cel-cel contacten [3]. RTKs worden over het algemeen geactiveerd door de binding van oplosbare groeifactoren, wat leidt tot dimerisatie en fosforylatie van de receptoren met als gevolg de activatie van allerlei signaaltransductieroutes [4].

Discoidine domein receptoren (DDR) zijn celoppervlakte receptoren die behoren tot de familie van de RTKs. In tegenstelling tot de andere RTKs worden DDRs onafhankelijk van integrines geactiveerd door collageen. Het extracellulaire ligand-bindende deel van de DDR receptor bevat een Discoidine 1 domein. Een homoloog van dit domein werd voor het eerst geïdentificeerd in het Discoidine I eiwit wat tot expressie komt in de slijmschimmel *Dictyostelium discoideum* waarin het een rol speelt in de intercellulaire adhesie in het aggregatieproces van de schimmel [5,6,7].

Er zijn twee verschillende genen die coderen voor DDRs, DDR1 en DDR2. Deze genen coderen voor twee verschillende typen DDRs die sterk aan elkaar verwant zijn. De twee receptoren verschillen van elkaar in het type collageen waardoor ze geactiveerd worden. DDR1 bindt alle typen collageen die tot dusverre zijn getest, collageen type I t/m VI en type VIII, DDR2 wordt alleen geactiveerd door fibrillaire collagenen; type I t/m III en type V [1]. Alternative splicing van het DDR1 gen resulteert in de vorming van 5 verschillende isovormen (a t/m e). DDR1a en DDR1b komen het meest voor [8]. Er zijn tot dusverre geen isovormen van DDR2 bekend [1].

Beide typen DDR komen wijdverbreid tot expressie gedurende de embryonale ontwikkeling en in verschillende volwassen weefsels. DDR1 komt tot expressie op het celoppervlak van epitheelcellen, specifiek in de nieren, longen, maag-darmkanaal en de hersenen, op leukocyten maar ook op de fibroblasten in cornea en dermis [9,10]. DDR2 komt voornamelijk tot expressie in de interstitiële cellen in hersenen, hart en skeletspier weefsel, nieren, longen en bindweefsel, maar de lokalisatie is nog onbekend [11, 12, 13].

Een opvallende eigenschap van de DDRs dat het relatief lang duurt voordat de receptor maximaal geactiveerd is, deze activatie houdt vervolgens langdurig aan en neemt langzaam weer af. Deze eigenschap van de receptor zorgt ervoor dat Activatie van de receptor een langdurig effect heeft.

Beide receptoren controleren processen tijdens de embryonale ontwikkeling en reguleren cel adhesie, migratie, proliferatie en remodeling van de ECM via expressie en activatie van MMPs Uit onderzoek is gebleken dat DDRs ook een rol spelen in de metastase van tumoren [1].

Op basis van deze resultaten is de hypothese ontstaan dat DDR1 een rol speelt in de regulatie van fibrose en ontstekingsreacties. Welke rol de DDRs spelen in ontstekingsreacties en fibrotische responsen is relevant voor de behandeling van dit type aandoeningen. Inhibitie van de DDRs is een potentieel therapeutisch doelwit in de strijd tegen fibrotische en inflammatoire aandoeningen in de toekomst. Dit artikel is een literatuurstudie naar de rol van de DDRs in fibrose en ontstekingsreacties.

2. Discoidine Domein Receptor

2.1. Ligand

DDR's worden geactiveerd door collageen binding. Collageen bestaat uit drie in elkaar gedraaide polypeptideketens die samen een driedubbele helix vormen. Elke enkele polypeptideketen is opgebouwd uit een herhaling van een sequentie van drie verschillende aminozuren. De driedubbele helici vormen met elkaar geordende structuren [14,2]. Collagenen zijn alleen in staat DDR's te activeren wanneer zij in hun natuurlijke configuratie, die van een driedubbele helix, binden aan het extracellulaire deel van de receptor. Beide typen DDR zijn niet in staat gedenatureerd collageen, gelatine, te binden [7].

Op dit moment zijn er 29 verschillend typen collageen bekend. De twee collageen subfamilies die het meest voorkomen in het menselijk lichaam zijn de fibrillaire en de netwerkvormende collagenen. Collageen type I, II, III, V en XI behoren tot de fibrillaire collagenen. Monomeren van deze typen collageen associëren met elkaar om lange dwarsgestreepte fibrillen te vormen. Collageen type IV, VIII en X vormen de subfamilie van de netwerkvormende collagenen. Monomeren van deze typen collageen associëren met elkaar tot netwerkvormende structuren. Netwerkvormend collageen type IV wordt vooral gevonden in basale membranen [14]. DDR1 kan geactiveerd worden door collageen type I t/m VI en type VIII. DDR2 wordt alleen geactiveerd door fibrillaire collagenen; type I t/m III en type V.

2.2. Structuur

Het extracellulaire domein van de DDR's bestaat uit een N-terminaal discoidine domein van ~160 aminozuren, gevolgd door een transmembraanregio van ~200 aminozuren, waarvan de sequentie specifiek is voor DDR's. Het cytoplasmatische domein wordt gevormd door een uitzonderlijk groot juxtamembraanmeel gevolgd door een katalytisch tyrosine kinase domein met een C-terminus. Het discoidine domein in de DDR bindt direct aan collageen en is verantwoordelijk voor receptoractivatie [15].

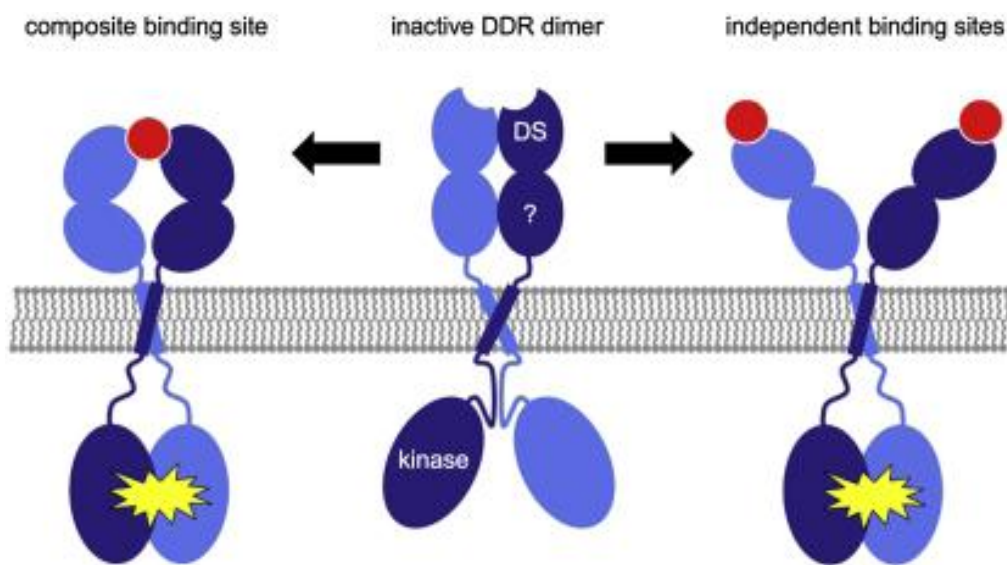
Aan de hand van de kristalstructuur van homologe discoidine, het C2 domein in de bloedcoagulatiefactor V, de collageen bindingssplek in de discoidine domein van de DDR2 receptor in kaart gebracht. In dit model zijn drie lussen waar te nemen die blootgesteld worden aan het celoppervlak. Deze drie lussen liggen ruimtelijk gezien dicht bij elkaar en zijn verantwoordelijk voor de collageen binding [15]. Homologen van deze loops ook in kaart gebracht voor de DDR1 receptor, waar ze ook betrokken zijn bij de collageen binding [16].

DDR's kunnen alleen als gedimeriseerde receptor collageen binden. Lange tijd heeft men gedacht dat ligandbinding verantwoordelijk was voor DDR receptor dimerisatie met receptor fosforylatie en activatie als gevolg, zoals het geval is in andere RTK's. Maar in moleculaire analyse van collageen binding door DDR's is aangetoond dat DDR dimerisatie een voorwaarde is om collageen te kunnen herkennen. De stimulatie van een DDR dimeer door collageen leidt tot een conformationele verandering in de receptor die resulteert in kinase activatie [15].

Uit een andere studie naar de structuur van DDRs is gebleken dat DDR1 en DDR2 voorkomen als stabiele dimeer in afwezigheid van collageen. Een onbekend autoinhibitie mechanisme zorgt ervoor dat de receptor inactief is in afwezigheid van collageen. Een bepaalde sequentie in de transmembraanregio, de zogenaamde leucine zipper is verantwoordelijk voor de specifieke conformatie veranderingen in de gedimeriseerde DDR1 receptor die leiden tot activatie [17].

2.3. Activatie en signaaltransductie

Het is nog onbekend of beide Discoidine domeinen in de DDR dimeer allebei dezelfde collageen driedubbele helix binden of dat ze onafhankelijk van elkaar aan collageen binden (Figuur1). Wat wel bekend is, is dat de collageenbinding aan de gedimeriseerde receptor leidt tot conformatie veranderingen in de receptor dimeer en dat leidt tot het opheffen van de auto-inhibitie van de cytoplasmatische tyrosine kinase domeinen[18].



Figuur 1. Mogelijke mechanismen voor de activatie van DDR. [18]

De fosforylatie van specifieke tyrosines in het cytoplasmatische domein van de receptor trekt allerlei intracellulaire signaal eiwitten aan. Deze eiwitten bevatten een Src-homology 2 (SH2) of een fosfotyrosine binding (PTB) domein waarmee ze aan de gefosforyleerde tyrosines kunnen binden. Deze signaleiwitten activeren een groot aantal verschillende signaaltransductieroutes, waardoor een groot aantal verschillende cellulaire processen in gang gezet kan worden [4].

Er is nog weinig bekend over de moleculen die een rol spelen in de signaaltransductie na activatie van DDRs. Activatie van DDR2 leidt tot het aantrekken en fosforyleren van de Src tyrosine, de receptor heeft het Src molecuul nodig om maximaal tyrosine gefosforyleerd te zijn. Het gefosforyleerde Src molecuul gaat vervolgens interactie aan met het adaptor molecuul Shc. Deze interactie leidt tot de activatie van de MMP-2 promotor [13].

3. De rol van DDR in de ontstekingsreactie

Een ontstekingsreactie in een weefsel trekt leukocyten aan om op de plek van schade of ontsteking te accumuleren en de schade te herstellen. Leukocyten moeten door de circulatie verlaten, de vasculaire wand passeren en daarna door het ECM naar de plek van beschadiging

migreren. Adhesiemoleculen zoals integrines en selectines zijn verantwoordelijk voor de migratie van circulerende leukocyten door de endotheellaag en het basaalmembraan van bloedvaten. Er is echter nog veel onduidelijk over hoe de monocytten door het onderliggende ECM migreren. DDR1 is betrokken bij de migratie van monocytten door een ECM netwerk model van driedimensionaal collageen. DDR1 expressie in monocytten wordt verhoogd wanneer ze geactiveerd worden en de circulatie verlaten door het vasculaire membraan. Infiltrerende monocytten gaan in het ECM interactie aan met collageen, dit resulteert in de conformatieverandering van monocytten die nodig is voor de migratie door dichtopeengepakt ECM. Proinflammatoire cytokinen zoals TNF- α en IL-1 β verhogen DDR1 expressie op monocytten [19].

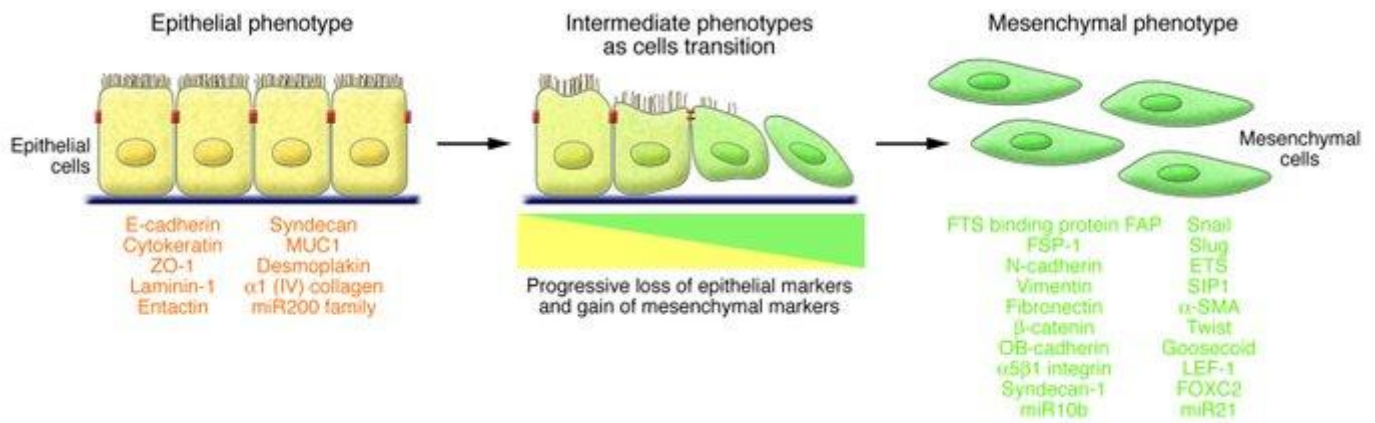
Onder normale omstandigheden brengen T-lymfocyten net als leukocyten een kleine hoeveelheid DDR1 tot expressie en beschikken de T-lymfocyten over de capaciteit om door driedimensionaal collageen te migreren. Activatie van T-cellen leidt tot een verhoging in de expressie van DDR1 en tot een verdrievoudiging van het vermogen van de cellen om door driedimensionaal collageen te migreren [8].

4. De rol van DDR in orgaan fibrose

Een ontstekingsreactie of weefselschade kan leiden tot de ontwikkeling van fibrose. Orgaan fibrose wordt gekenmerkt door een verhoogde afzetting van ECM in een orgaan, met name van fibreus collageen type I. Fibrose is een proces wat in eerste instantie in gang gezet wordt om de schade te herstellen, maar wanneer het micromilieu chronisch ontstoken is en de fibrose zich verder ontwikkelt kan het leiden tot verlies van orgaan functie.

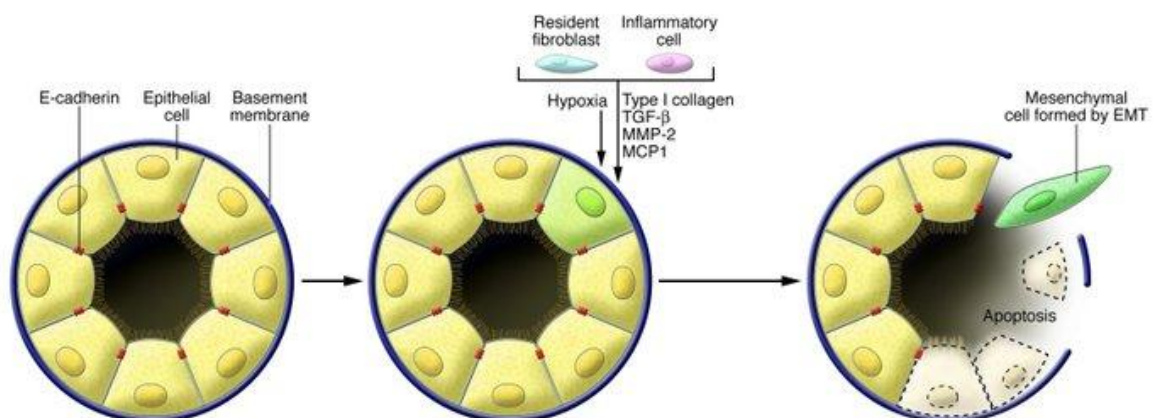
Orgaantransplantatie is dan nog de enige oplossing. Orgaan fibrose kan verschillende organen treffen, de longen, de lever, het hart en de nieren. Hoewel de oorzaken van orgaan fibrose per orgaan verschillen, vertonen de mechanismen die leiden tot de ontwikkeling van fibrose in verschillende organen veel overeenkomsten [20].

Fibroblasten zijn de hoofdrolspelers in de ontwikkeling van orgaan fibrose, een chronisch ontstoken micromilieu in het orgaan stimuleert deze cellen om collageen te produceren. Er zijn in het lichaam drie verschillende bronnen van fibroblasten, endogene fibroblasten, fibroblasten afkomstig uit het beenmerg en fibroblasten die zijn ontstaan uit epitheelcellen of endotheelcellen. Onder inflammatoire omstandigheden kunnen epitheelcellen veranderen in fibroblasten via het proces van epitheel-mesenchym transitie (EMT) of endotheel-mesenchym transitie (EndMT). Het fenotype van de epitheelcel verandert in dat van een fibroblast. De morfologie van de cel verandert van kubusvormig in fibroblastvormig. De epitheelcel verliest zijn polariteit, intercellulaire adhesiemoleculen zoals E-Cadherine en Zonula occludentes proteïne (ZO-1) verdwijnen en worden vervangen door mesenchymale markers zoals fibroblast specific proteïn-1 (FSP-1) α Smooth Muscle actin (α SMA), vimentine, collageen1, desmine en DDR2 (Figuur 2).



Figuur 2. EMT. *Verandering van polariteit, morfologie, expressie van celtype specifieke markers en vermogen tot migratie in de Epitheel-Mesenchym Transitie. Cellen die markers van beide type cellen tot expressie brengen doorlopen het EMT proces [21].*

De cel wordt in staat om eiwitten te produceren die matrix degraderen, matrix metalloproteinases (MMPs) waardoor de cel van een immobiele epitheelcel die gehecht is aan het ECM, verandert in een mobiele mesenchymcel die de mogelijkheid heeft om het basaal membraan af te breken en door het ECM te migreren (Figuur 3).



Figuur 3. EMT en fibrose. *Fibroblasten en ontstekingscellen op de plaats van weefselschade scheiden cytokines uit die het basaalmembraan afbreken en EMT induceren [21].*

In een chronische ontstekingsreactie produceren leukocyten pro-inflammatoire cytokines zoals TNF α en IL-1. Deze cytokines activeren de NF κ B signaaltransductieroute, stimuleren TGF β 1 synthese en trekken ontstekingscellen aan, met name macrofagen en T-lymfocyten. NF κ B reguleert ander andere de transcriptie van genen die verantwoordelijk zijn voor fenotypische verandering van de epitheelcellen.

TGF β 1 aangewezen als de belangrijkste activator van de EMT. TGF β 1 inhibeert de expressie van allerlei proteinases en ECM degraderende eiwitten, verhoogt de productie van matrix eiwitten en activeert endogene fibroblasten. TGF β 1 induceert de productie van ECM degraderende eiwitten, de matrixmetalloproteinases (MMP), MMP2 en MMP9, wat leidt tot degradatie van collageen type I en type IV en daarmee afbraak van het basaal membraan. Bovendien functioneert TGF β 1 als chemoattractant voor leukocyten. De interactie tussen

TGF β 1 en allerlei pro-inflammatoire cytokinen resulteert in een micromilieu waarin het proces van EMT continu versterkt wordt door allerlei autoregulatorische feedback loops [20,21,22,23].

Uit verschillende studies is gebleken dat DDRs een rol spelen in de ontstekingsreactie en orgaan fibrose.

4.1. Nieren

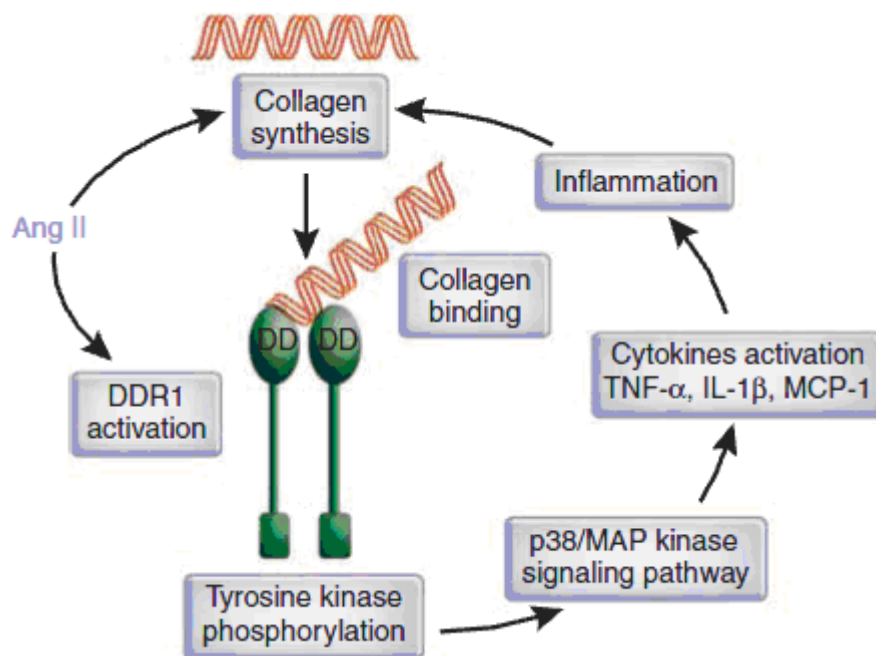
Een ontstekingsreactie in de nier kan veroorzaakt worden door een aantal verschillende aandoeningen zoals diabetes mellitus, hypertensie, primaire glomerulopathiën, auto-immuunziekten, toxische schade, transplantaatafstoting of aangeboren afwijkingen. Renale fibrose wordt gekenmerkt door een excessieve afzetting van fibreus ECM, met name van collageen type 1, in de nieren. Als gevolg van deze matrix depositie ontstaan glomerulosclerose, interstitiële fibrose en degradatie van de tubuli. In het fibrose proces in de nieren veranderen epitheelcellen in de tubuli via EMT in collageenproducerende fibroblasten. Er is een directe correlatie te zien tussen toename van het aantal epitheel cellen die in EMT zijn en de afname van excretiefunctie van de nieren [23].

De expressie van DDR1 in de glomeruli beschadigd nierweefsel is verhoogd ten opzichte van de expressie in intacte nieren. Deze bevinding wijst op een mogelijke rol voor de DDR1 receptor in glomerulosclerose. Dit is aangetoond in een onderzoek naar de lokalisatie van DDRs in de nieren. Uit dit onderzoek is ook gebleken dat DDR1 tot expressie komt op het basolaterale membraan van specifieke delen van het nefron. Van de connecting tubule tot aan de renale papilla. DDR1 komt tot expressie dicht bij collageenrijke delen van het nefron, wat logisch is ten opzichte van de rol van deze receptor in cel-matrix interacties. DDR2 komt tot expressie op de apicale membranene van specifieke delen van het nefron, van de lus van Henle tot aan de macula densa. DDR2 komt in de nier tot expressie ver van collageen, DDR2 speelt mogelijk een rol in ziektes met verstoorde polariteit van het epitheel [24].

DDR1 speelt een rol bij de adhesie en proliferatie van mesangiale cellen. Mesangiale cellen zijn cellen in de interstitiële ruimtes in de glomerulus die een rol spelen in de filtratie en zorgen voor stevigheid in de glomerulus. Onder normale omstandigheden produceren mesangiale cellen kleine hoeveelheden collageen type I. Glomerulosclerose leidt tot een verhoogde proliferatie van en collageenproductie door mesangiale cellen. In een onderzoek van Curat is de proliferatie en adhesie van geïsoleerde mesangiale cellen uit DDR1 knock-out muizen vergeleken met die in wildtype muizen. DDR1 komt tot expressie op het plasmamembraan van primaire mesangiale cellen van de muis en is verantwoordelijk voor de hechting aan collageen. Uit dit onderzoek is gebleken dat stimulatie van DDR1 met collageen leidt tot p38 en p42/p44 MAPK fosforylatie in MAPK signaaltransductieroutes, wat resulteert in een verhoogde proliferatie. Opvallend is dat inactief DDR1 mesangiale proliferatie remt doordat de receptor de p38 en p42/p44 MAPK fosforylatie in MAPK signaaltransductieroutes blokkeert. In dit onderzoek wordt gespeculeerd dat DDR1 als gevolg van glomerulosclerose steeds meer wordt blootgesteld aan collageen wat leidt tot activatie van de receptor en als gevolg daarvan tot fosforylatie van de p42/p44 and p38 MAPK met als resultaat een verhoogde proliferatie en dat DDR1 mogelijk direct of indirect een rol speelt in collageen expressie en MMP activiteit [10].

DDR1 knock-out muizen zijn beschermd tegen de ontwikkeling van nierfalen als gevolg van hypertensie. Angiotensine II kan hoge bloeddruk induceren wat kan leiden tot een ontstekingsreactie in de nieren. Uit een onderzoek naar de relatie tussen DDR1 receptoren en

de ontwikkeling van nierfalen als gevolg van hypertensie is gebleken dat de infiltratie van leukocyten in de glomerulus en perivascuaireregio verwaarloosbaar is in DDR1 knock-out muizen en dat de ophoping van matrix in de vorm van collageen type I en IV in knock-out muizen verminderd is. De bloeddruk in knock-out muizen was evenveel toegenomen als de bloeddruk in wildtype muizen. DDR1 expressie in de bloedvaten en glomeruli in de cortex neemt toe als gevolg van hypertensie. In de glomerulus van knock-out muizen zijn minder plekken van overmatige ECM afzetting te vinden dan in wildtype muizen. Angiotensine stimuleert onafhankelijk van DDR1 collageen productie. Deze verhoogde collageenproductie resulteert via positieve feedback in een verhoging van de DDR1 expressie en activatie in niervaten. Geactiveerd DDR1 versterkt de ECM depositie (Figuur 4). Een opvallende ontdekking uit deze studie is dat DDR1 ook betrokken is bij de ontstekingsreactie in nierfalen als gevolg van hypertensie. Infiltrerende ontstekingscellen zijn in tegenstelling tot wildtype muizen afwezig in DDR1 knock-out muizen. Uit deze bevinding kan geconcludeerd worden dat DDR1 Een rol speelt in het aantrekken, de infiltratie en cytokineproductie van ontstekingscellen [25, 26].



Figuur 4. De rol van DDR1 in de ontwikkeling van renale fibrose.

Angiotensine II verhoogt collageensynthese en DDR1 expressie, collageen activeert DDR1 wat leidt tot fosforylatie van de receptor. Deze activatie leidt tot inductie van de p38 signaaltransductieroute wat leidt tot cytokineproductie. Cytokines stimuleren meer collageensynthese en DDR1 expressie. Een positieve feedbackloop tussen ontsteking, DDR1 expressie en ECM synthese resulteert uiteindelijk in nierfibrose [26].

DDR1 speelt een rol in de ontwikkeling van chronische fibrose en de ontwikkeling van chronische ontsteking. In een van deze onderzoeken is gekeken naar de relatie tussen het ontbreken van DDR1 receptoren en de ontwikkeling van het Alport syndroom (AS). In AS veroorzaken mutaties in de genen die coderen voor type IV collageen structurele veranderingen in het glomerulaire basaal membraan (GBM). Type IV collageen is een netwerkvormend type collageen wat wordt geproduceerd door podocyten, de glomerulaire epitheelcellen.

Afwezigheid van de DDR receptoren in muizen met AS bleek de levensduur te verlengen ten opzichte van wildtypemuizen met AS, de uremia en proteïnurie waren in knock-out muizen verminderd ten opzichte van wildtypemuizen. TGF β , CTGF en NF κ β komen tot overexpressie in wildtype muizen met AS, wat resulteert in matrix depositie en fibrose in de glomerulus en de tubuli. Afwezigheid van DDR1 resulteert in een verminderde infiltratie van T-lymfocyten en macrofagen in de tubuli in dieren met AS ten opzichte van wildtype dieren met AS. In een lokalisatie experiment is aangetoond dat DDR1 tot expressie komt op het basolaterale membraan van podocyten [9].

Uit aan andere studie van Gross et al. Is gebleken dat Knock-out muizen last hebben van proteïnurie door een verdikking van het glomerulaire basaalmembraan en defecten in de filtratiefunctie. DDR1 is belangrijk voor de handhaving van de normale structuur en functie van renaal epitheel [27].

4.2. Longen

Idiopatische pulmonale fibrose (IPF) is een longaandoening waarvan de oorzaak nog grotendeels onbekend is, virale infecties, de blootstelling aan giftige stoffen en oxidanten verhogen de kans op het ontwikkelen van longfibrose. Chronische ontsteking van het micromilieu in de longen kan leiden tot IPF wat wordt gekarakteriseerd door verhoogde proliferatie van fibroblasten, verhoogde afzetting van ECM en collageen in de intertistiële ruimtes in de longen. Functioneel aveoliweefsel wordt vervangen door littekenweefsel. DDR1 komt tot expressie op het basolaterale celoppervlak van bronchiale epitheelcellen. DDR1 knock-out muizen zijn beschermd tegen longfibrose. De ontstekingsreactie en fibrosevorming als gevolg van beschadiging van het longweefsel met Bleomycine is in DDR1 knock-out muizen en wildtype muizen met elkaar vergeleken. De proliferatie en migratie van myofibroblasten door het basaalmembraan, fibrosevorming, de leukocytinfiltratie en de cytokine productie is in wildtypemuizen verhoogd ten opzichte van knock-out muizen. De p38 MAPK signaaltransductieroute wordt in wildtypemuizen geactiveerd in reactie op beschadiging van het longweefsel, deze activatie wordt niet waargenomen in de knock-outmuizen en kan de verschillen in fibrosevorming en ontstekingsreactie in beide typen muizen verklaren. Fibrosevorming is het resultaat van een doorgeschoten poging om beschadigd weefsel te herstellen, onder normale omstandigheden stimuleert een inflammatoir micromilieu het herstel van de beschadigde bronchiale epitheelcellen.

Activatie van DDR1 komt langzaam op gang en houdt langdurig aan, dit is een mogelijke verklaring voor de rol van DDR1 in de ontwikkeling van longfibrose. De activatie van DDR1 leidt tot een signaal wat constant ontsteking en fibrose stimuleert waardoor een chronische ontstekingsreactie ontstaat en het beschadigde weefsel geen tijd krijgt om zich te herstellen en nieuw epitheel te vormen [28].

In een DDR1 knockdown studie is DDR1 expressie in humane bronchiale epitheelcellen (HBECs) geremd met RNA interferentie. DDR1 inhibitie vermindert herstel van beschadigd epitheel, MMP-7 productie en proliferatie van HBECs, DDR1 inhibitie heeft geen effect op adhesie van HBECs aan collageen type 1. HBECs produceren MMP-7, MMPs spelen een rol in het herstel van beschadigd epitheel en cel-matrix interacties en zijn verantwoordelijk voor de remodelering van ECM. Als gevolg van epitheelbeschadiging komt ECM bloot te liggen, collageenrijk type IV basaal membraan ECM activeert DDR1. DDR1 stimuleert migratie van HBECs. DDR1 stimuleert migratie op twee manieren. Adhesie en interactie met andere celoppervlakte receptoren kan migratie stimuleren zonder dat daarvoor kinase activiteit van de DDR1 receptor voor nodig is. Kinase activiteit van de receptor is wel nodig om MMP-7 te

kunnen synthetiseren. MMP-7 is verantwoordelijk voor het loslaten van en cel van zijn ECM en draagt op die manier bij aan migratie [29].

4.3. Lever

Hepatische fibrose wordt gekenmerkt door vervanging netwerkvormend collageen type IV door fibrillair collageen type I in een basaalmembraan-achtige matrix in de ruimte tussen hepatocyten en endotheelcellen. Stellate cellen zijn verantwoordelijk voor de productie van collageen type I, onder normale omstandigheden zijn deze cellen inactief en liggen ze in de ruimte tussen hepatocyten en endotheelcellen. Stellate cellen worden geactiveerd door accumulatie van type I collageen en MMP-2 een enzym wat verantwoordelijk is voor de degradatie van subendotheliale matrix. Collageen type I activeert de DDR2 receptor, dit stimuleert MMP-2 productie wat de proliferatie en de migratie van geactiveerde stellate cellen door het basaalmembraan stimuleert. De samenstelling van het ECM reguleert de expressie van DDR2 in stellate cellen. De activatie van stellate cellen is afhankelijk van de samenstelling van het ECM, wanneer door collageen type I geactiveerde stellate cellen worden overgeplaatst op een model voor collageen type IV rijk basaalmembraan-achtige matrix keren de stellate cellen terug naar een geïnactiveerd staat en is de DDR2 expressie verminderd. In deze studie is aangetoond dat fibrose in de lever niet geïnitieerd wordt door DDR2, maar dat DDR2 de fibrotische respons versterkt en in stand houdt. DDR2 fosforylatie treedt pas op wanneer er al collageen type I geproduceerd wordt. Collageen type I fungeert als autocrien ligand. Fosforylatie van de DDR2 receptor komt langzaam op gang, houdt langdurig aan en is dus een langdurige stimulus voor matrix degradatie, proliferatie en migratie van stellate cellen door de basaalmembraan en de receptor wordt langzaam gedefosforyleerd. Onder normale omstandigheden komt DDR2 inactief tot expressie in de lever. Pas wanneer de lever beschadigd wordt en er ligand beschikbaar komt, is de DDR2 receptor in gefosforyleerde staat aanwezig in de lever [30].

4.4. Wondheling

DDR2 expressie in huid fibroblasten speelt een rol in verstoorde wondheling processen, waarin functioneel weefsel wordt vervangen door niet functioneel littekenweefsel. Verhoogde afzetting van collageenrijke matrix verstoort de heling van de huid [1]. Huid fibroblasten geïsoleerd uit DDR2-knock-out muizen kunnen niet door een geconstrueerd basaal membraan migreren en hebben een verlaagde MMP-2 productie ten opzichte van huid fibroblasten geïsoleerd uit wildtype muizen. In respons op extracellulair collageen type I stimuleert DDR2 proliferatie, migratie door en remodelering van het ECM via MMP-2 productie en collageen type I expressie in fibroblasten in de huid. In deze studie is bewezen dat collageen type I productie en celproliferatie elkaar stimuleren in een positieve feedbackloop. Collageen type I geproduceerd door huid fibroblasten stimuleert DDR2 fosforylatie, DDR2 stimuleert collageen productie [31].

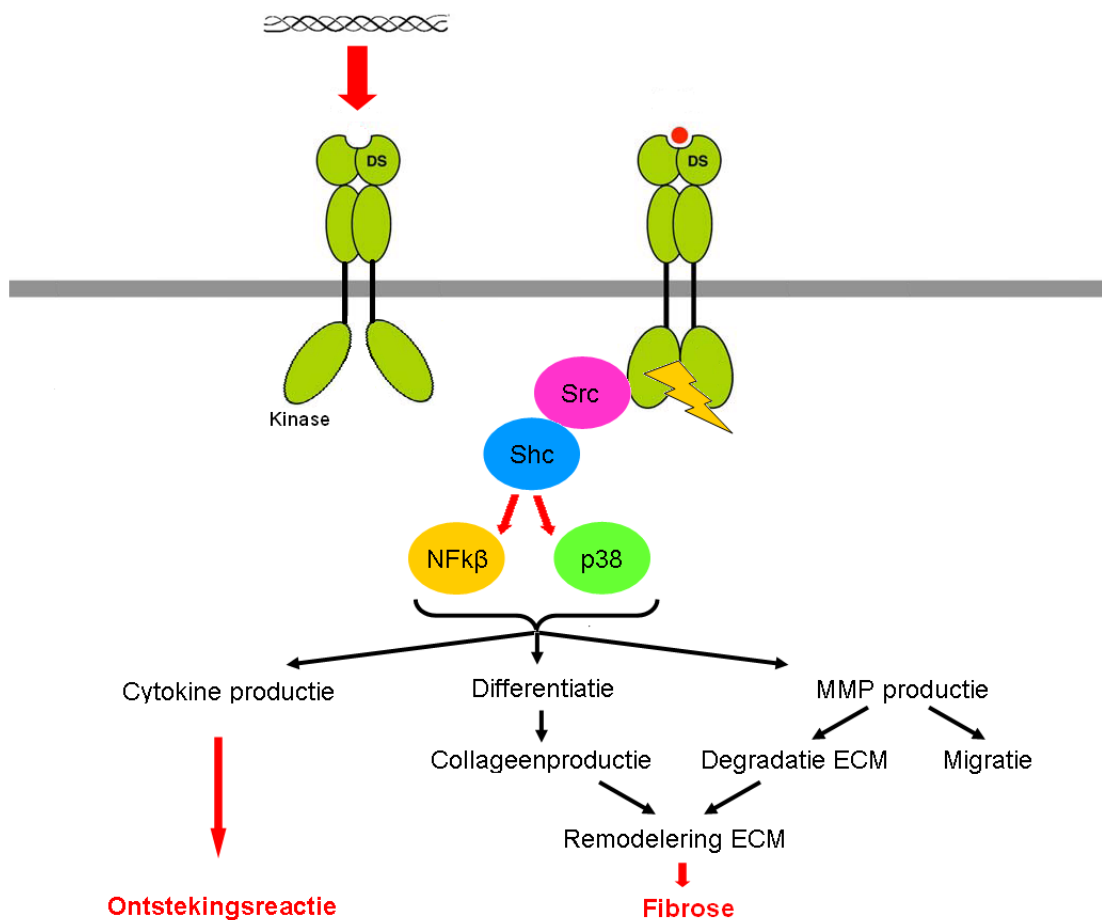
5. Discussie

Hoewel studies met knock-out muizen de kennis over het mechanisme en de rol van DDRs in ontsteking en fibrose hebben vergroot, is er nog veel onbekend over de DDRs. Het is nog onbekend over de interactie tussen receptor en ligand. Onduidelijk is nog welk specifieke deel in collageen, verantwoordelijk is voor de binding aan en activatie van DDR, welke specifieke conformationele veranderingen deze binding in de receptor teweegbrengt en hoe deze veranderingen leiden tot fosforylatie van de receptor. Ook zijn er nog veel vragen over de signaaltransductieroute die geactiveerd worden via receptorfosforylatie. Het is onduidelijk welke signaaleiwitten en transcriptiefactoren precies betrokken zijn bij de routes en van welke specifieke genen DDR de transcriptie reguleert. Het feit dat er nog veel onduidelijk is over

DDRs en dat we nog met veel vragen zitten, maakt DDRs tot een interessant onderzoeksgebied. Door knock-out studies is er meer bekend over de cellulaire responsen die gereguleerd worden door DDR. DDR knock-out studies zijn weefsel en receptor specifiek wat het lastig maakt om op basis van één studie een uitspraak te doen over de rol van DDR in de ontstekingsreactie en fibrose.

In deze literatuurstudie is getracht een overzicht te geven van de huidige stand van zaken in het onderzoek naar DDRs. Op basis van de onderzoeksresultaten van de verschillende studies is met iets meer zekerheid iets te zeggen over de rol van DDR in fibrose.

Samenvattend resulteert binding van collageen aan het extracellulaire ligand-bindende deel van een gedimeriseerde DDR receptor tot conformationele veranderingen in de receptor die de verantwoordelijk zijn voor autofosforylatie waardoor de receptor geactiveerd wordt. De Activatie van de receptor leidt tot het aantrekken van de tyrosine kinase Src die vervolgens het adaptoreiwit Shc aantrekt, dit molecuul activeert onder andere de NF κ B signaaltransductieroute, de p38 MAPK signaaltransductieroute en de MMP promotor. Activatie van de NF κ B en p38 MAPK signaaltransductieroutes resulteert in cytokine productie, proliferatie van de cellen met een geactiveerde DDR en in differentiatie van deze cellen tot collageenproducerende cellen. Verhoogde MMP productie stimuleert de migratie van cellen door het ECM. Zowel collageen productie als MMP gemedieerde afbraak van ECM componenten dragen bij aan de remodelering van het ECM. (Figuur 6)



Figuur 6. Samenvatting van de rol van DDR in de ontstekingsreactie en fibrose.

Al deze bevindingen beschouwend kom ik tot de conclusie dat beide typen DDR de ontstekingsreactie en de fibrotische respons in reactie op weefselschade stimuleren en in stand houden. Beide processen worden niet geïnduceerd door DDRs. Collageen fungeert in deze processen als een autocrien ligand, de verhoogde collageenproductie vormt een nieuw ligand waarop DDR kan aangrijpen, via positieve feedback versterkt het proces zichzelf. De langzame activatie en langzame deactivatie van DDR leidt tot langdurige signalering. Het feit dat de het effect van DDR lang aanhoudt draagt bij aan de stimulatie van een chronisch ontstoken micromilieu wat resulteert in de ontwikkeling van orgaanfibrose.

DDR's zijn mogelijk zeer interessante kandidaten voor de behandeling van inflammatoire en fibrotische aandoeningen. Aangezien DDR's aanjagers van de ontstekingsreactie en fibrotische respons zijn, heeft inhibitie van de receptor mogelijk een positief effect op de genezing van en fibrotische aandoeningen. Er is nog veel onbekend over de precieze werking van de receptor en er is in de toekomst nog veel uitdagend onderzoek naar de DDR te verrichten!

Dankwoord

Op deze plek wil ik Eliane Popa graag hartelijk bedanken voor haar kritische houding, enthousiasme en inspirerende begeleiding. Dit stuk had zonder haar niet tot stand kunnen komen.

Literatuurlijst

1. Vogel WF, Abdulhussein R, Ford CE: *Sensing extracellular matrix: An update on discoidin domain receptor function.* Cellular Signaling, 2006.
2. Shrivastava A, Radziejewski C, Campbell E, Kovac L, McGlynn M, Ryan TE, Davis S, Goldfarb MP, Glass DJ, Lemke G, Yancopoulos GD: *An Orphan Receptor Tyrosine Kinase Family Whose Members Serve as Nonintegrin Collagen Receptors.* Molecular Cell, 1997.
3. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D: *Integrins.* Cell and tissue research, 2010.
4. Lemmon MA, Schlessinger J: *Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases.* Cell, 2010.
5. Rosen SD, Kafka JA, Simpson DL, Barondes SH: *Developmentally Regulated, Carbohydrate-Binding Protein in Dictyostelium discoideum.* Proceedings of National Academy of Sciences, 1973.
6. Poole S, Firtelt RA, Lamare E: *Sequence and Expression of the Discoidin I Gene Family in Dictyostelium discoideum.* Journal of Molecular Biology, 1981.
7. Vogel WF: *Discoidin domain receptors: structural relations and functional implications.* The FASEB Journal, 1999.
8. Hachehouche LN, Chetoui N, Aoudjit F: *Implication of discoidin domain receptor 1 in T cell migration in three-dimensional collagen.* The FASEB Journal, 2001.
9. Gross O, Girgert R, Beirowski B, Kretzler M, Kang HG, Kruegel J, Miosge N, Busse AC, Segerer S, Vogel WF, Müller GA, Weber M: *Loss of collagen-receptor DDR1 delays renal fibrosis in hereditary type IV collagen disease.* Matrix biology 2010
10. Curat C, Vogel WF: *Discoidin Domain Receptor 1 Controls Growth and Adhesion of Mesangial Cells.* Journal of the American Society of Nephrology, 2002.
11. Vogel W, Gish GD, Alves F, Pawson T: *The discoidin domain receptor tyrosine kinases are activated by collagen.* Molecular Cell, 1997.
12. Leitinger B, Hohenester E: *Mammalian collagen receptors.* Matrix Biology, 2007.
13. Ikeda K, Wang LH, Torres R, Zhao H, Olaso E, Eng FJ, Labrador P, Klein R, Lovett D, Yancopoulos GD, Friedman SL, Lin HC: *Discoidin Domain Receptor 2 Interacts with Src and Shc following Its Activation by Type I Collagen.* Journal of biological chemistry, 2002.
14. Prockop DJ, Kivirikko KI: *Collagens: Molecular Biology, Diseases, and Potentials for Therapy.* Annual Review of Biochemistry, 1995.
15. Leitinger B: *Molecular Analysis of Collagen Binding by the Human Discoidin Domain Receptors, DDR1 and DDR2; Identification of collagen binding sites in DDR2.* The Journal of Biological Chemistry, 2003.
16. Abdulhussein R, McFadden C, Fuentes-Prior P, Vogel WF: *Exploring the Collagen-binding Site of the DDR1 Tyrosine Kinase Receptor.* The journal of biological chemistry, 2004.
17. Noordeen NA, Carafoli F, Hohenester E, Horton MA, Leitinger B: *A Transmembrane Leucine Zipper Is Required for Activation of the Dimeric Receptor Tyrosine Kinase DDR1.* The journal of biological chemistry, 2006.
18. Carafoli F, Bihan D, Stathopoulos S, Konitsiotis AD, Kvensakul M, Farndale RW, Leitinger B, Hohenester E: *Crystallographic Insight into Collagen Recognition by Discoidin Domain Receptor 2.* Structure, 2009.
19. Kamohara H, Yamashiro S, Galligan C, Yoshimura T: *Discoidin domain receptor 1 isoform-a (DDR1a) promotes migration of leukocytes in three-dimensional collagen lattices* FASEB J. 2001.
20. López-Novoa JM, Nieto MA: *Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression.* EMBO Molecular Medicine, 2009.
21. Kalluri R, Weinberg RA: *The basics of epithelial-mesenchymal transition.* The journal of Clinical Investigation, 2009.
22. Zeisberg M, Kalluri R: *The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis.* Journal of Molecular Medicine, 2004.
23. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG: *Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis.* Journal of Clinical Investigation, 2002.
24. Lee R, Eidman KE, Kren SM, Hostetter TH, Segal Y: *Localization of Discoidin Domain Receptors in Rat Kidney.* Nephron Experimental Nephrology, 2004.
25. Flamant M, Placier S, Rodenas A, Curat CA, Vogel WF, Chatziantoniou C, Dussaulte JC, *Discoidin Domain Receptor 1 Null Mice Are Protected against*

- Hypertension-Induced Renal Disease.*
Journal of the American Society of Nephrology, 2006.
26. Ronco P, Chatziantoniou C: *Matrix metalloproteinases and matrix receptors in progression and reversal of kidney disease: therapeutic perspectives.* International Society of Nephrology, 2008.
 27. Gross O, Beirowski B, Hervey SJ, Mcfadden C, Chen D, Tam S, Thorner PS, Smyth N, Addicks K, Bloch W, Ninomiya Y, Sado Y, Weber M, Vogel WF: *DDR1-deficient mice show localized subepithelial GBM thickening with focal loss of slit diaphragms and proteinuria.* Kidney International, 2004.
 28. Avivi-Green C, Singal M, Vogel WF: *Discoidin Domain Receptor 1-deficient Mice Are Resistant to Bleomycin-induced Lung Fibrosis.* American Journal of respiratory and critical care medicine, 2006.
 29. Roberts ME, Magowan L, Hall IP, Johnson SR: *Discoidin Domain Receptor 1 Regulates Bronchial Epithelial Repair and Matrix Metalloproteinase Production.* European respiratory journal, 2010.
 30. Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, Xu L, Wang LH, Lin HC, Friedman SL: *DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells.* Journal of clinical investigation, 2001.
 31. Olaso E, Labrador JP, Wang LH, Ikeda K, Eng FJ, Klein R, Lovett DH, Lin HC, Friedman SL: *Discoidin Domain Receptor 2 Regulates Fibroblast Proliferation and Migration through the Extracellular Matrix in Association with Transcriptional Activation of Matrix Metalloproteinase-2.* Journal of biological chemistry, 2002